

- reinforcement on the fracture toughness and flexural strength of provisional restorative resins[J]. J Prosthet Dent, 2004, 91(3):258-264.
- 4 Lassila LV, Tanner J, Le Bell AM, et al. Flexural properties of fiber reinforced root canal post[J]. Dent mater, 2004, 20(1):29-36.
- 5 Aydin M Y, Kargul B. Glass-fiber reinforced composite in management of avulsed central incisor: a case report[J]. J Dent Child (Chic), 2004, 71(1):66-68.
- 6 潘小波,侯永福,杨征. 可塑纤维弯曲强度的测定[J]. 华西医学, 2008, 23(4):692-693.
- 7 Fokkinga WA, Le Bell AM, Kreulen CM, et al. Ex vivo fracture resistance of direct resin composite crowns with and without posts on maxillary premolars[J]. Int Endod J, 2005, 38(4):230-237.
- 8 Freeman G. The carbon fiber post metal-free, post-endodontic rehabilitation[J]. Oral Health, 1996, 86(2):23-30.
- 9 王宁,骆小平,俞长路,等. 高强度纤维桩树脂核的临床应用研究[J]. 口腔医学, 2005, 25(3):149-151.
- [收稿日期 2009-03-04][本文编辑 韦挥德 章柯滔]

论 著

应用 SELDI-TOF-MS 技术分析多发性骨髓瘤患者血清差异表达蛋白

唐娟, 彭宽, 李山

基金项目:广西研究生创新基金项目(编号:2007105981002M17)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学研究生院

作者简介:唐娟(1983-),女,硕士研究生,检验师,研究方向:临床血液诊断学

通讯作者:李山,教授,广西医科大学第一附属医院临床医学实验部主任。E-mail:lis8858@163.com

[摘要] 目的 研究多发性骨髓瘤患者血清蛋白质谱的变化,从而筛选出特异性蛋白标志物。方法 利用 CM10 蛋白芯片和 SELDI-TOF-MS 技术对 30 例初诊为多发性骨髓瘤的患者和 33 例健康人的血清蛋白进行分析。获得的蛋白质谱图采用 Ciphergen 公司的 Biomarker Wizard 软件分析。结果 通过对多发性骨髓瘤患者血清与健康人血清蛋白质谱图分析发现有 30 个蛋白峰表达量有明显差异($P < 0.05$),与健康对照组相比,10 个蛋白峰表达上调,20 个蛋白峰表达下调,质荷比为 3472.79、7778.39、4093.01、4971.15、5343.98 的蛋白更具意义。结论 结果表明通过多发性骨髓瘤患者与健康对照血清蛋白质谱的比较,有助于筛选得到多发性骨髓瘤的特异性标志物。

[关键词] 多发性骨髓瘤; SELDI-TOF 质谱仪; 差异蛋白

[中图分类号] R 733.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2009)06-0558-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.06.05

Detection of serum differential expression protein by SELDI-TOF-MS technology in the patients with multiple myeloma TANG Juan, PENG Kuan, LI Shan. Post-graduate College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To analyze differential expression protein in the patients with multiple myeloma by proteomic technology. **Methods** Serum protein from 30 patients with multiple myeloma at preliminary diagnosis (MM group) and 33 healthy people control group were analyzed by CM10 proteinchip array and surface-enhanced laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). Ciphergen Biomarker wizard software was used to identify proteomic features. **Results** The analysis of the protein map showed, there was significant difference between two groups ($P < 0.05$) in 30 protein peaks. Compared with the control group, 10 protein peaks were up-regulated expression and 20 protein peaks were down-regulated expression in MM group. Five protein peaks (3472.79, 7778.39, 4093.01, 4971.15, 5343.98) were of more significance. **Conclusion** The comparison between the patients with multiple myeloma and healthy people in the serum protein is helpful to screen serum specific

markers of multiple myeloma.

[Key words] Multiple myeloma; SELDI-TOF-MS; Differential protein

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)亦称浆细胞骨髓瘤,为最常见的浆细胞恶性增生疾病。其主要合成与分泌大量的单克隆免疫球蛋白(M蛋白),并伴有正常免疫球蛋白减少;浆细胞克隆恶变大量增生,侵犯骨髓与骨质产生广泛溶骨病变和(或)骨质疏松,引起骨骼疼痛、病理性骨折、贫血、出血、肾功能损害、反复感染等一系列临床表现。其发病率占造血系统恶性肿瘤的10%~15%,常见于中、老年人,随着年龄增加,其发病率也明显升高。分析MM蛋白质动态,可以探知疾病早期最微小的指标和征兆,找出MM的早期临床线索,减少误诊、漏诊,使病人得到正规、及时、有效的治疗。本研究应用表面增强激光解析离子化飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)对初诊为多发性骨髓瘤患者血清蛋白质谱进行分析,旨在筛选出多发性骨髓瘤的标志性蛋白。

1 材料与方法

1.1 临床资料 来自本院血液内科临床上初诊为多发性骨髓瘤的患者30例,男性19例,女性11例,平均年龄为56岁;来自我院体检的正常健康人33例,男性20例,女性13例,平均年龄为54岁。病例组与对照组在性别比例和年龄上无统计学差异。所有的标本均在清晨空腹下抽取,-80℃保存。

1.2 主要试剂与仪器 乙酸钠、尿素(urea)、乙腈(acetonitrile)、三氟乙酸(TFA)、3-环乙胺-1-丙磺酸(CHAPS)和SPA(sinapinic acid)均购自美国Sigma公司。蛋白质芯片弱阳离子交换芯片CM10及SELDI-TOF质谱仪由美国Ciphergen公司生产。

1.3 方法

1.3.1 血清样品制备 将保存于-80℃样品取出置冰盒上融解,10 000 rpm 4℃离心2 min,取10 μl上清液加入20 μl蛋白变性剂(9 mol/L 尿素、2% CHAPS、1% DTT、1 mol/L Tris-HCl, pH 9.0),4℃振荡30 min。取10 μl蛋白变性液,加入结合缓冲液(50 mmol/L 乙酸钠, pH 4.0),混匀,使血清的总稀释倍数达到39倍。

1.3.2 CM10 蛋白质芯片处理 将CM10芯片装入芯片处理器(Bioprocessor),每孔芯池中加入200 μl结合缓冲液,使弱阳离子与芯池活性表面整合,置振荡器400~600转/分振荡5 min,甩掉缓冲液。将处理好的血清样本100 μl加入芯池中,置振荡器400~600转/分,4℃振荡1 h弃去多余液体,再加入200结合缓冲液重复操作,甩掉。每孔加入200 μl 1 mM HEPE,洗脱未与芯池表面结合的蛋白质或肽段。取出芯片,风干后将各孔加两次SPA,每次0.5 μl。

1.3.3 检测方法 用标准芯片校正质谱仪,设定仪器参数:最高分子量50 000道尔顿,优化范围2 000到20 000道尔顿,激光强度190,检测敏感度8,每个样本取130个点的平均值。将处理好的芯片置于SELDI-TOF质谱阅读器中进行,结果分析使用Ciphergen proteinchip3.2软件处理。信号噪声(signal-to-noiseratio, S/N)大于5为有效波峰^[1]。

1.4 统计学处理 质比荷以m/z值表示,用Biomarker Wizard软件快速计算相同质荷比(M/Z)的蛋白在MM组与对照组间峰值差异含量,用P值表明其差异程度。

2 结果

2.1 波峰检测(peak dection) 检测30份MM组血清和对照组30份血清样品的蛋白分子量区间设定在1 500~20 000 D,低于1 500 D的蛋白质或肽段将自动从图谱中清除^[2],因在0~1 500 D区间存在结合物、试剂成分、SPA及其他化学成分影响数据分析。CM10芯片进行检测后,所得蛋白质用波峰图谱表示,共得到57个波峰。

2.2 波峰整合(peak alignment)与软件分析 用Biomarker Wizard软件对MM组和对照组进行t检验,分析蛋白质谱图,计算差异含量。本组研究30个蛋白峰表达有显著差异(P<0.05),10个蛋白峰高表达,20个蛋白峰低表达见表1。相对分子量为3472.79、7778.39、4093.01、4971.15、5343.98的蛋白峰更具意义见图1。

表1 多发性骨髓瘤组(MM)与健康对照组(N)质谱中差异蛋白表达

M/Z	P	Mean - mm	SD - mm	Mean - n	SD - n	Expression of biomarkers
3472.792	8.55E-07	6.740289	4.505134	2.763614	1.723752	↑
7778.391	1.0866E-06	2.394782	1.194557	6.920177	4.320689	↓
4093.007	6.3573E-06	28.36481	12.16149	63.22916	33.6976	↓
6199.008	6.3573E-06	1.501419	1.058988	3.968295	2.421855	↓

续表 1

M/Z	P	Mean - mm	SD - mm	Mean - n	SD - n	Expression of biomarkers
9305.132	7.9309E-06	2.895712	2.239905	8.811012	6.199363	↓
11699.55	3.0632E-05	3.274809	5.046247	0.846083	1.054127	↑
2740.792	5.6397E-05	12.5553	14.98979	35.57015	28.7521	↓
3586.984	8.3825E-05	5.586579	3.59438	2.454578	2.818167	↑
3937.936	9.5484E-05	5.268057	2.192924	10.10398	5.842417	↓
4971.154	0.00024611	3.578075	2.290087	8.560011	6.313837	↓
3142.772	0.00039913	5.178935	4.347738	2.369967	1.460891	↑
4507.146	0.00042355	4.805086	3.013857	2.484616	1.889553	↑
5911.348	0.00050545	14.71088	7.953183	30.30718	16.74191	↓
9422.505	0.00060192	2.672392	2.464997	6.259325	5.058876	↓
5343.976	0.0007153	6.426175	2.75324	11.76343	6.707634	↓
6108.887	0.00075731	2.037063	1.385875	3.477292	1.69574	↓
10277.03	0.00075731	0.448125	0.285206	0.940896	0.620484	↓
2137.031	0.00084828	8.982349	12.36353	2.512674	3.939982	↑
7982.564	0.00164321	1.502316	0.637647	2.35619	1.156253	↓
4797.657	0.00182874	3.452894	1.763961	5.655239	2.963963	↓
4178.245	0.00203333	4.253618	2.221377	6.135698	2.268284	↓
8154.463	0.00482642	1.128262	0.541005	1.810373	0.94818	↓
6883.465	0.0074266	3.27324	1.707944	2.185725	0.949681	↑
3400.672	0.01121998	4.156497	3.840576	5.610201	3.169176	↓
9200.927	0.01121998	5.710561	7.395134	25.74671	31.72105	↓
3269.203	0.012267	3.672729	1.959594	5.767912	3.923502	↓
4653.574	0.01594549	6.020058	4.502116	3.315769	1.758733	↑
4889.285	0.01594549	8.050535	5.470426	5.201336	4.035505	↑
6446.679	0.02738099	6.713407	2.640423	9.566166	5.134758	↓
3700.247	0.03470063	3.414396	2.069846	2.394321	2.074451	↑

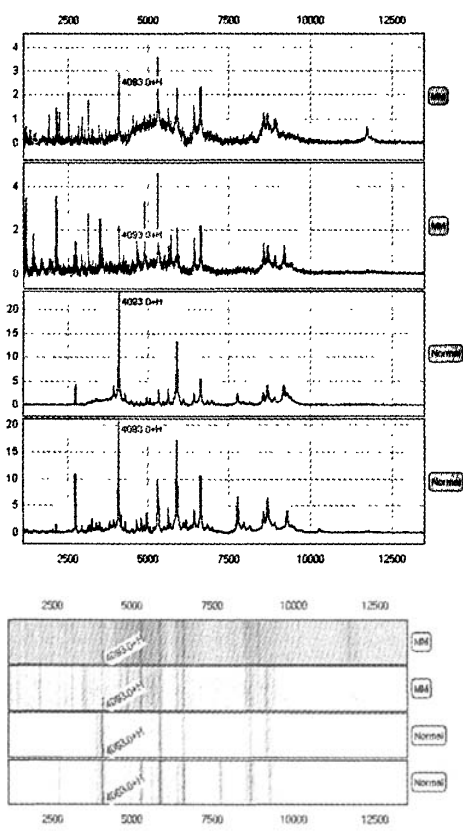


图 1 质荷比为 4093.0 蛋白峰在 MM 和健康对照组中差异表达的峰形图和模拟凝胶

3 讨论

3.1 近年来随着城市人口的老龄化和人们对 MM 认识水平的提高,病例数显著增加。美国的最新统计资料表明:在血液系统肿瘤中,MM 的发病率已超过急性白血病,仅次于非霍奇金淋巴瘤,位居第二。在非洲的美国人中,它是导致死亡的十大肿瘤之一。随着我国老龄化的加快,MM 的发病也有逐年增高的趋势。由于 MM 临床表现为多样化,起病缓慢,早期无临床症状,在临床中许多患者不完全具备典型特征,常因症状不典型而误诊。近年来对于 MM 的实验室检查方法不断改进,如骨髓穿刺细胞学涂片、免疫固定蛋白电泳对 M 蛋白的鉴定、Ig 的含量测定、 κ/λ 的比值测定,流式细胞术测定瘤细胞上的表面标志,实时定量 PCR 杂交探针法测定 MM 患者 IgH 的拷贝数,原位荧光杂交 FISH 分析核型易位变化等从分子免疫学、分子生物学及细胞遗传学水平为研究 MM 的早期线索与发病机制提供了临床依据。

3.2 本研究应用 SELDI 蛋白芯片技术对 MM 特异性蛋白质动态分析,探知 MM 早期最微小的指标和征兆,尽量找出 MM 早期临床线索,减少误诊、漏诊,使患者能得到正规、及时、有效的治疗。SELDI 蛋白芯片技术是从层析技术和质谱技术发展而来,其表面可结合特定的蛋白质。该技术所需样品体积小,

不会破坏所测定的蛋白质,检测简便,特异性和灵敏度高,且可将传统方法检测不到的蛋白或多肽检出^[3,4]。细胞内数以万计的不同蛋白质及其裂解或修饰形式是细胞生理或病理活动的反映,这种蛋白质和蛋白质片段随着周围的血液和淋巴液进入循环,因而在血清蛋白质中,除大分、高丰度的驻留蛋白(resident protein)如白蛋白和其它载体蛋白(carrier protein)外,还有低丰度的小分子蛋白质或蛋白质片段,后者包含着大量的诊断信息^[5]。对照分析患者和正常人的质谱图,可发现在 30 个差异蛋白峰中,多数蛋白峰下调。如捕获到质荷比为 4903.01 蛋白可能是 MM 早期进展相关一种标志蛋白。因此,鉴定出这些蛋白分子,并进一步研究其构象、氨基酸组成及生物学功能,将有助于探讨疾病的发生机制,并为设计治疗靶点提供依据,对蛋白质数据库的进一步完善具有重要意义。

3.3 SELDI-TOF-MS 应用于临床研究为时不长,

且在多发性骨髓瘤中的研究国内尚无类似报道,本组病例不够多,虽能供统计学分析,也显示其可喜的前景,但仍有必要继续积累病例资料。

参考文献

- 1 Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, et al. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer [J]. Clin Chem, 2002, 48(8): 1296 - 1304.
- 2 Banez LL, Prasanna P, Sun L, et al. Diagnostic potential of serum proteomic patterns in prostate cancer[J]. J Urol, 2003, 170(2 Pt 1): 442 - 446.
- 3 Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface - enhanced laser desorption/ ionization - time of flight mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1164 - 1177.
- 4 Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S, et al. Proteomics in early detection of cancer[J]. Clin Chem, 2001, 47(10): 1901 - 1911.
- 5 Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: written in blood [J]. Nature, 2003, 425(6961): 905.

[收稿日期 2009-03-18][本文编辑 韦挥德 黄晓红]

论 著

持续性皮下胰岛素输注对初诊 2 型糖尿病患者 β 细胞第一时相功能的影响

陈根本, 陈孺子, 陈坚贞, 林 权, 陈永松, 陈介东

基金项目: 广东省第三批科技计划项目(编号: 2008146)

作者单位: 515638 广东潮安县人民医院内科(陈根本, 陈孺子, 陈坚贞, 林 权); 515041 汕头大学医学院第一附属医院内分泌科(陈永松); 515438 揭西县棉湖华侨医院(陈介东)

作者简介: 陈根本, 大学本科, 副主任医师, 大内科副主任兼急诊科主任, 研究方向: 内分泌疾病急症处理。

E-mail: cgb3390463@126.com

[摘要] 目的 探讨持续性皮下胰岛素输注(CSII)对初诊 2 型糖尿病患者 β 细胞第一时相功能的影响。方法 将 42 例初诊 2 型糖尿病患者随机分为治疗组和对照组, 治疗组采用 CSII, 对照组仅皮下胰岛素注射, 两组治疗前及治疗后 2 周采用 IVGTT 试验胰岛素曲线下面积进行疗效评估。结果 治疗组 2 周后, 对照组及治疗组与治疗前对比 IVGTT 试验胰岛素曲线下面积均显著升高, 治疗组比较对照组 IVGTT 试验胰岛素曲线下面积升高更明显, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 持续性皮下胰岛素输注能快速有效地提高初诊 2 型糖尿病患者 β 细胞第一时相胰岛素分泌功能。

[关键词] 持续性皮下胰岛素输注; 糖尿病; β 细胞

[中图分类号] R 587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2009)06-0561-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.06.06

Effect of continuous subcutaneous insulin infusion on the first - phase insulin secretion function of β cell in newly diagnosed type 2 diabetes' s patients CHEN Gen - ben, CHEN Ru - zi, CHEN Jian - zhen, et al. Depart-